

ARTIGO

<https://doi.org/10.22239/2317-269x.01065>

Revisão integrativa para substituição do soro fetal bovino por plasma humano rico em plaquetas para cultivo e expansão ex vivo de células humanas destinadas às terapias avançadas

Integrative review for replacement of fetal bovine serum by platelet-rich human plasma for culture and ex vivo expansion of human cells for advanced therapies

Karla Menezes*

Esther Rieko Takamori

Marcus Vinicius Telles Teixeira

Rosana Bizon Vieira Carias

Radovan Borojevic

RESUMO

Introdução: O avanço dos ensaios clínicos e da terapia celular implicam na necessidade de substituição do soro fetal bovino por um produto de origem humana, capaz de sustentar a expansão de células humanas destinadas às pesquisas e terapias celulares. **Objetivo:** Esta revisão integrativa teve como objetivo principal avaliar diferentes alternativas de suplementação de cultura celulares livres de produtos animais, chamadas de culturas celulares *xeno-free*. **Método:** Foi realizada a análise de 50 artigos recuperados do PubMed publicados até janeiro de 2018 em língua inglesa ou em português. **Resultados:** O plasma rico em plaquetas (PRP) é considerado como uma boa alternativa para suplementação do meio de cultura celular. O PRP é obtido a partir do sangue, e possui um rico conteúdo liberado pelas plaquetas ativadas, capaz de estimular a proliferação e a diferenciação de diversos tipos de células, tanto diferenciadas quanto progenitoras. A utilização do PRP em sistemas de cultura celular *xeno-free* não oferece risco de alterações genéticas da população celular, tampouco sua contaminação com patógenos. As vantagens de sua utilização incluem: 1) a possibilidade de uso de soro autólogo; 2) redução de riscos de contaminação; 3) facilidade de preparo e 4) baixo custo de produção. **Conclusões:** O uso de concentrado de plaquetas descartados nos centros de hemoterapia é uma boa alternativa para a produção do PRP, que será utilizado sistematicamente na cultura de células humanas. O desafio é padronizar esse processo de produção, de forma a garantir a qualidade do produto destinado às terapias avançadas.

PALAVRAS-CHAVES: Plasma Rico em Plaquetas; Cultura Celular; Terapia Celular; Ensaios Clínicos

ABSTRACT

Introduction: The advancement of clinical trials and cell therapy require the replacement of fetal bovine serum by a product of human origin, capable of sustaining an expansion of human cells for research and cell therapy. **Objective:** This integrative review had as main objective to evaluate different alternatives of cell culture supplementation free of animal products, called *xeno-free* cell cultures. **Method:** Fifty selected articles from PubMed published up to January 2018 in English or Portuguese were evaluated. **Results:** Platelet rich plasma (PRP) is considered to be a good alternative for supplementation of the cell culture media. PRP is obtained from blood, and has a rich content released by activated platelets, capable of stimulating proliferation and differentiation of several cell types, both fully differentiated and the progenitor ones. Use of PRP in “*xeno-free*” cell culture systems has apparently no risk of genetic alterations of the cells, nor their contamination with pathogens. Advantages of its use include: 1) the possibility of using autologous serum; 2) reducing the risk of contamination; 3) easy preparation and 4) low cost of production. **Conclusions:** The use of discarded platelet concentrate in hemotherapy centers is a good alternative for the production of PRP, which will be used systematically in the culture of human cells. The challenge is to standardize this production process, in order to grant the quality of the product to be used in advanced therapies.

KEYWORDS: Platelet-rich Plasma; Cell Culture; Cell Therapy; Clinical Trials

Faculdade de Medicina de Petrópolis
/FASE, Petrópolis, RJ, Brasil

* E-mail: karlamenezess@gmail.com

Recebido: 13 out 2017

Aprovado: 31 jan 2018



INTRODUÇÃO

O soro fetal bovino (SFB) é o suplemento mais utilizado para a expansão *ex vivo* de células humanas destinadas a ensaios clínicos e terapias celulares. No entanto, as diretrizes de boas práticas de fabricação de insumos para uso clínico (*Good Manufacturing Practice - GMP*) recomendam substituir os produtos derivados de animais por produtos quimicamente definidos, ou por produtos derivados de humanos.

O SFB não é um produto definido e, sendo de origem bovina, as reações imunológicas contra antígenos xenogênicos no organismo receptor não podem ser excluídas. As proteínas do SFB associam-se ao complexo principal (maior) de histocompatibilidade (CPH) de classe I em culturas celulares de longo prazo, levando à proliferação de células T no recipiente, mesmo numa configuração de uso de células autólogas cultivadas¹. Os glicoconjugados do soro bovino podem ser diretamente transferidos do meio de cultivo às células e incorporados nas membranas de células cultivadas, permanecendo na sua composição por até 48 horas, podendo causar uma reação imunológica aguda. Patógenos e seus derivados como micoplasmas, endotoxina bacteriana, vírus e príons não são necessariamente eliminados do meio de cultivo de células contendo soro bovino, e podem ser potencialmente transferidos para os pacientes que irão receber o transplante celular^{2,3,4,5}. Além disso, existem preocupações sobre o desajuste entre as demandas globais e os suprimentos do SFB, de um ponto de vista ético e de bem-estar animal, uma vez que o SFB é coletado de fetos bovinos^{6,7}. É importante considerar também o problema da variabilidade lote a lote do SFB, com diferenças qualitativas e quantitativas decorrentes de influências geográficas e sazonais. O conjunto destes fatores leva os órgãos regulatórios a recomendarem o desenvolvimento de protocolos de cultura celulares livres de produtos animais, chamadas de culturas celulares *xeno-free*^{6,7}.

O desafio é encontrar um substituto biológico de origem humana, que não ofereça riscos à saúde e que seja capaz de sustentar a proliferação celular. As quantidades de células usadas em ensaios clínicos ou terapias celulares são altas, podendo atingir ou ultrapassar a ordem de 100.000.000 de células por paciente, o que requer uma alta e prolongada estimulação da proliferação celular *in vitro*⁸. Também, é importante manter o perfil celular desejado ao longo do processo de expansão *in vitro*, que pode variar de um estágio mais imaturo até alcançar um estágio completo de diferenciação celular, dependendo da qualidade de meio de cultivo e de seus suplementos⁹.

Diferentes populações de células humanas são avaliadas em ensaios clínicos. Células adultas, em estágios avançados de diferenciação celular, podem ser isoladas de tecidos humanos e ser aplicadas no tratamento de doenças específicas. Elas possuem uma capacidade de proliferação celular limitada, por isso, sua aplicação clínica é restrita. Células progenitoras e/ou células-tronco adultas, por outro lado, apresentam um

alto potencial de proliferação celular e podem dar origem a diferentes linhagens celulares, sendo alvo de inúmeros estudos. O tipo de célula-tronco mais avaliado em ensaios clínicos no mundo é a célula mesenquimal estromal (*mesenchymal stem cell - MSC*)⁹. Neste momento, existem 760 estudos clínicos que avaliam a segurança e eficácia do tratamento com MSC em diferentes patologias*. As principais características das MSC incluem: aderência a superfícies de plástico, morfologia fibroblastoide, expressão de marcadores de superfície (CD105, CD73 e CD90), capacidade de formar colônias a partir de uma única célula (colônias formadoras de células fibroblásticas, CFU-F) e de se diferenciar em células de origem mesodérmica e ecto-mesodérmica^{10,11}. MSC são facilmente expandidas *in vitro* e são consideradas imunologicamente inertes, o que reduz o risco de rejeição do transplante celular¹². A maioria dos estudos abordam MSC isoladas a partir de cordão umbilical humano, sangue periférico, medula óssea ou tecido adiposo, mas as MSC podem ser isoladas, *a priori*, a partir de qualquer tecido adulto humano¹³.

Este estudo de revisão teve como objetivo avaliar diferentes alternativas de suplementação de cultura celulares *xeno-free*. Em particular, investigamos o potencial de utilização do plasma rico em plaquetas humano como substituto do SFB em cultura de células humanas.

MÉTODO

Este estudo foi elaborado como uma revisão integrativa. Foram avaliados 50 de 75 artigos científicos que abordavam métodos de suplemento de cultura *xeno-free*, comparando técnicas e resultados encontrados. A pesquisa de literatura científica foi realizada em documentos do Ministério da Saúde e por consulta à base de dados do PubMed para artigos publicados em inglês ou português até janeiro de 2018. Palavras-chave utilizadas: *cell culture, xeno-free, platelet-rich plasma, plasma, platelet lysate, chemically-defined xeno-free medium, cell therapy, clinical trials, mesenchymal stem cells, progenitor cells, human cells, human serum*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alternativas para sistemas de cultura *xeno-free*

Existem diferentes suplementos de cultura celular *xeno-free* comercialmente disponíveis no mercado. A princípio, esses produtos industrializados são padronizados e não interferem no perfil celular¹⁴. No entanto, alguns estudos alertam sobre alterações biológicas importantes de algumas células humanas quando cultivadas com meios de cultura *xeno-free* comerciais. MSC de tecido adiposo humano, cultivadas em sistema de cultura *xeno-free* com produtos industrializados, apresentaram uma redução significativa da aderência celular e perda do

* Fonte: clinicaltrials.gov. Acesso em 20 set 2017.



marcador de superfície celular CD54 (ICAM-1). Também foram detectadas variações na expressão de CD11a, CD14, CD10 e CD86, os quais estão relacionados com a interação das MSC com células do sistema imunológico, o que pode ter afetado a sua imunogenicidade¹⁵. Além disso, as MSC não conseguem formar esferoides quando cultivadas em três dimensões com alguns tipos de meios de cultura *xeno-free*¹⁶. Existe uma mudança no perfil genético destas células humanas, com redução da produção de citocinas anti-inflamatórias e moléculas antitumorais¹⁶. Acredita-se que o potencial terapêutico das MSC possa ser comprometido com a utilização de determinados produtos *xeno-free* comerciais^{15,16}. Existe um pensamento equivocado de que estes produtos industrializados são quimicamente definidos e totalmente desprovidos de produtos animais. Na verdade, eles possuem fatores de crescimento em quantidades indefinidas e podem ser suplementados com albumina de soro humano ou animal¹⁵.

Outra opção de suplementação de cultura celular *xeno-free* é a adição de fatores de crescimento ao meio de cultura. Eles podem ser sintéticos ou derivados de tecido animal ou humano, sendo utilizados de forma isolada ou combinados como um coquetel¹⁵. O uso de fatores de crescimento tem sido associado ao aumento da proliferação celular^{16,17} e pode induzir um fenótipo celular específico¹⁶. No entanto, sua aplicabilidade é reduzida porque eles não são capazes de sustentar a expansão celular a longo prazo¹⁵.

Derivados plaquetários humanos aplicados em sistemas de cultura celular *xeno-free*

Produtos derivados do plasma sanguíneo humano são considerados hoje como os potenciais substitutos do SFB para sistemas de cultura celular *xeno-free*^{18,19}. O plasma sanguíneo puro, coletado de um doador em estado fisiológico normal, contém normalmente baixas quantidades de fatores de crescimento celular. Entretanto, ele abriga as plaquetas que, apesar de apresentarem uma cito-arquitetura relativamente simples, possuem um conteúdo complexo e muito bem organizado. Esse conteúdo é liberado somente com a ativação das plaquetas. Isto pode ocorrer sob efeito de sinalização de fatores circulantes pró-inflamatórios, indicando a presença de uma agressão ou irritação tecidual. Alternativamente, uma lesão das paredes vasculares pode causar um sangramento grave e necessitar ser imediatamente resolvida. Ela expõe as plaquetas ao contato com a matriz extracelular tecidual, principalmente colágeno e os glicoproteínas associados, que imediatamente ativam as plaquetas, causando a liberação do seu conteúdo. A primeira consequência é a ativação *in situ* das cascatas de coagulação do sangue, que interrompe o sangramento com a liberação dos seus grânulos os fatores bioativos como serotonina, histamina, dopamina, cálcio e adenosina.

Tanto a inflamação quanto a ativação das plaquetas pela adesão nos tecidos lesados sinalizam também a necessidade de iniciar os processos de reparo tecidual. Essa é a segunda função das plaquetas ativadas, sendo elas os primeiros

componentes sanguíneos que chegam no local da lesão e liberam seus conteúdos granulares para promover o reparo tecidual²⁰. Nessa função, as plaquetas funcionam como grandes reservatórios de enzimas, hormônios e fatores de crescimento. Diversos fatores de crescimento celular já foram identificados, dentre eles: fator de crescimento tumoral (*transforming growth factor-b* - TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor* - PDGF), fator de crescimento tipo insulina I e II (*insulin-like growth factor* I, II - IGF-I, IGF-II), fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor* - FGF), fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor* - EGF), fator de crescimento vaso-endotelial (*vascular endothelial growth factor* - VEGF) e fator de crescimento de células endoteliais (*endothelial cells growth factor*). Estes fatores de crescimento e moléculas bioativas, produzidas pelas plaquetas, modulam e estimulam as células locais a promoverem regeneração. Esta sua capacidade moduladora é a principal justificativa de utilizar o conteúdo plaquetário em um ambiente de cultivo celular²¹.

Os produtos derivados de plaquetas que estão sendo avaliados em sistemas de cultura celular *xeno-free* são: 1) Plasma Puro (PP); 2) Plasma Rico em Plaquetas (PRP); 3) Lisado Plaquetário (LP). O PP e o PRP são obtidos através de uma sequência de centrifugações do sangue periférico. O PP é obtido através de apenas uma centrifugação, enquanto o PRP é obtido após duas ou mais centrifugações consecutivas. O LP, também conhecido como Hormônios Derivados de Plaquetas (HDP), é obtido através de centrifugações seguidas pela adição de agonista de epinefrina, e posteriormente, ciclos repetidos de criocongelamento e descongelamento e choque hipotônico para interromper a membrana plasmática das plaquetas e liberar todos os seus conteúdos^{18,19}.

Em comum, todos eles possuem os mesmos componentes biológicos, isto é, possuem o rico conteúdo plaquetário. Porém, existe uma grande divergência nas nomenclaturas e nos métodos de preparo destes produtos biológicos. Não há um padrão no número de centrifugações, velocidade e temperatura ideal para isolar cada um destes produtos, nem mesmo existe um consenso sobre protocolo específico para cultura de cada tipo de célula⁵⁶. As variações englobam também aspectos como seleção de doadores, processo de coleta (aférese ou doação de sangue total), presença de solução aditiva, implementação de inativação de patógenos, tipo de ativação plaquetária, presença ou não de leucorredução e consideração sobre grupos sanguíneos ABO. Todos estes fatores podem influenciar a sua aplicabilidade¹⁹. O uso de PP, PRP ou LP como suplementos de cultura de células humanas possui efeitos distintos no comportamento celular e pode influenciar de forma diferente a migração, proliferação e diferenciação de células humanas (Tabela). A variabilidade do processo de produção é um problema para padronização destes produtos biológicos, e deve ser prioridade no processo de desenvolvimento de uma alternativa de culturas celulares *xeno-free*¹⁹.

Tabela. Comparação entre diferentes produtos derivados do sangue periférico humano, utilizados como suplemento de cultura celular *xeno-free*.

Produtos	siglas	Método de obtenção	Vantagens	Desvantagens	Resultados em cultura de células				Produção de proteínas da matriz extracelular	Inflamação
					Proliferação celular	Fenótipo celular	Diferenciação celular	Migração celular		
1) Plasma Puro	PP	Única centrifugação do sangue, em baixa rotação e velocidade ⁹ .	* O preparo do PP é fácil, rápido e com menor custo, em relação ao PRP e LP ²² .	* Baixa concentração de plaquetas e fatores de crescimento em relação ao PRP e LP ²² .	* PP exibe um efeito semelhante ao SFB na proliferação de MSC de tecido adiposo humano expandidas <i>in vitro</i> ^{5,14} .	* PP utilizado como suplemento de cultura de MSC de tecido adiposo humano não altera seu fenótipo ^{5,14} .	* PP não altera seu potencial de diferenciação celular de MSC humanas ^{5,14} , mas a diferenciação osteogênica pode ser menos favorável na suplementação com PP do que com SFB ²³ .	-	* MSC humanas expandidas em PP alogênico podem entrar em sofrimento e sofrerem apoptose ^{24,25} .	-
2.1) Plasma Rico em plaquetas	PRP	Duas ou mais centrifugações consecutivas do sangue periférico.	* O PRP apresenta maior concentração de plaquetas e fatores de crescimento do que o PP ²² . * A suplementação com PRP humano de cultura de MSC humanas não provoca a formação de tumores ²⁶ .	* É necessário um grande volume de sangue para preparo do PRP ¹⁴ . * Existe uma variabilidade biológica entre amostras de PRP ¹⁴ . * PRP utilizado com PRP humano diferentes de cultura de MSC humanas não provoca a formação de tumores ²⁶ .	* A proliferação celular de MSC humanas suplementadas com PRP é 13,9 vezes maior do que quando elas são cultivadas com SFB ²⁷ . * PRP utilizado como suplemento de cultura <i>xeno-free</i> aumenta a proliferação de mioblastos ²⁸ , tenócitos ²⁹ , condrócitos ^{30,31} , MSC da medula óssea ¹⁰ , MSC de tecido adiposo humanos ^{27,32,33} .	* A suplementação da cultura de MSC humanas com PRP não modifica seu fenótipo, e não provoca alterações cromossômicas ²⁷ . * PRP, utilizado como suplemento de cultura <i>xeno-free</i> , não modifica a capacidade de diferenciação de MSC humanas ^{5,19,21,27,31} .	* PRP, utilizado como suplemento de cultura celular, estimula a diferenciação de MSC ^{34,35,36} , osteoblastos ³⁷ e células-tronco de polpa dentária humanas ³⁸ . * PRP, utilizado como suplemento de cultura <i>xeno-free</i> , não modifica a capacidade de diferenciação de MSC humanas ^{5,19,21,27,31} .	* PRP aumenta a migração <i>in vitro</i> de condrócitos ³¹ , osteoblastos ^{31,37} , fibroblastos gengivais ^{39,40} humanos e MSC de medula óssea humana ¹⁰ .	* PRP, utilizado como suplemento de cultura celular, estimula a produção de colágeno tipo II e proteoglicanos por MSC subcondral ¹⁰ e tenócitos humanos ³⁹ .	* PRP, utilizado como suplemento de cultura de MSC humanas, preserva as propriedades imunoregulatórias ^{5,21,19,26,27} .
2.2) Plasma rico em plaquetas em forma de gel	Gel de PRP	Uma ou duas centrifugações consecutivas do sangue e adição de cálcio ou trombina para ativação da cascata de coagulação ^{26,41} .	* O gel de PRP favorece a formação de uma rede celular tridimensional (3D) ^{41,42} que mimetiza o ambiente <i>in vivo</i> , e suas sinalizações célula a célula e extracelular ^{43,44} .	* O preparo do gel de PRP é complexo, depende da concentração adequada de plaquetas e requer um grande volume de sangue ⁹ .	* O gel de PRP estimula a proliferação <i>in vitro</i> de células endoteliais humanas ⁴² e fibroblastos humanos ⁴¹ .	* O gel de PRP favorece a formação de esferóides em culturas 3D de MSC da medula óssea humana ²⁶ , tenócitos ⁴³ , fibroblastos ^{26,41} humanos.	* O hidrogel de PRP estimula a tenogênese de MSC de medula óssea ⁴⁶ . * O gel de PRP estimula a diferenciação celular de fibroblastos humanos ⁴¹ .	-	-	* O hidrogel de PRP diminui a expressão de citocinas inflamatórias por MSC de medula óssea ²⁶ e também por fibroblastos de pele humana ³⁹ .
3) Lisado Plaquetário	LP	Duas centrifugações consecutivas do sangue, adição de epinefrina, congelamento, descongelamento, e choque hipotônico ⁹ .	LP apresenta uma maior concentração de plaquetas do que o PP ou o PRP ^{45,46,47,48} .	* O preparo do LP é complexo, com grande variabilidade biológica ⁹ . * O LP utilizado na cultura de MSC humanas pode induzir a formação óssea ectópica ³⁴ .	* LP aumenta a proliferação de MSC humana cultivadas <i>in vitro</i> ^{49,50,51,52,53,54} .	* Não há alterações cromossômicas das MSC cultivadas em LP ^{49,50,51,52,54,55} .	* LP, utilizado como suplemento de cultura de MSC humanas, mantém seu potencial de diferenciação celular ^{5,14,50,51,52,53,54} , e pode estimular a diferenciação osteogênica ³⁴ .	-	* LP, utilizado como suplemento de cultura de MSC humanas, preserva as propriedades imunoregulatórias ^{53,54,56} .	-



Plasma Rico em Plaquetas como suplemento de cultivo celular

Dentre os diferentes produtos plaquetários, o PRP é considerado o suplemento mais promissor para cultura de células humanas destinadas ao uso clínico^{5,19,21,27,32,40}. O PRP é obtido através de uma sequência de centrifugações do sangue fresco, que tem como objetivo aumentar a concentração de plaquetas em pequeno volume do próprio plasma²¹. As vantagens de sua utilização em culturas de células humanas *xeno-free* são: 1) possibilidade de utilização de soro autólogo para preparo do implante celular; 2) redução de riscos de contaminação cruzada e reações imunológicas indesejadas para o paciente; 3) presença de fatores de crescimento que estimulam proliferação e diferenciação celular; 4) facilidade e seu preparo; 5) baixo custo de produção e 6) possibilidade de uso alogênico para cultura celular de larga escala.

O rico conteúdo liberado pelas plaquetas ativadas, presentes no PRP, é capaz de estimular a proliferação celular e a diferenciação de diversos tipos celulares, desde células adultas até as células progenitoras²². O PRP foi avaliado como suplemento de cultura *xeno-free* em diferentes tipos de células adultas humanas, tais como: fibroblastos de pele⁴¹, fibroblastos gengivais^{38,39,40}, células de ligamento periodontal³⁹, osteoblastos³⁷, condrócitos^{27,31}, mioblastos²⁸, tenócitos^{26,29} e fibrocondrócitos de menisco humano³⁷. O gel de PRP também tem sido estudado como uma forma de abrigar células cultivadas *in vitro*^{41,42,43,44}. Ele consegue criar um ambiente favorável para a formação de uma rede celular tridimensional (3D)⁴⁴ e oferece um suporte adequado para fibroblastos de pele⁴¹ e células endoteliais⁴².

Em geral, os estudos pré-clínicos avaliaram a capacidade de adesão, migração, proliferação e diferenciação celular na adição do PRP no meio de cultura. Não há relatos de formação de tumores em nenhum estudo^{5,19,21,27,32,40}. O uso de PRP favorece a adesão celular no substrato da cultura e estimula a migração através da reorganização do citoesqueleto celular³⁹. O PRP não afeta o potencial de proliferação celular e, em alguns casos, pode ampliar a capacidade de expansão *in vitro* destas células humanas^{10,28,29,30,31}. Já o efeito do PRP sobre o potencial de diferenciação celular varia de acordo com o tipo de célula cultivada. Mioblastos de músculo esquelético humano não se diferenciam na presença de PRP no meio de cultura²⁸. Por outro lado, células progenitoras de tenócitos são induzidas a se diferenciar em tenócitos e passam a produzir colágeno²⁹. O mesmo comportamento é observado com células progenitoras de condrócitos. O PRP induz sua diferenciação em condrócitos e promove a formação de um tecido cartilaginoso denso e compacto, rico em colágeno tipo II e proteoglicanos¹⁰.

Outra população de células que tem sido alvo de muitos estudos que utilizam o PRP em culturas celulares *xeno-free* é a MSC^{14,27}. Os riscos de transmissão viral a partir de soro animal e o potencial de indução imunológica contra o antígeno bovino em pacientes foram relatados e suscitam preocupações sobre o uso de SFB para o preparo de MSC para pacientes submetidos à investigação clínica^{2,3,4}. Embora o meio de cultura isento de soro seja uma condição opcional para o preparo das MSC e um recurso comercialmente disponível, as características das MSC parecem serem variáveis de acordo com o tipo de meio utilizado^{58,59}.

A suplementação do meio de cultura com PRP humano tem sido recomendada para o preparo de MSC destinadas a protocolos clínicos^{14,19,60}. As justificativas para esta recomendação são: 1) o PRP adicionado ao meio de cultura não provoca ou estimula a formação de tumores ou variações genéticas ou fenotípicas das MSC cultivadas *in vitro*²⁷; 2) o PRP estimula a proliferação do MSC sem comprometer a sua capacidade de diferenciação^{5,19,27,32} e o seu imunofenótipo celular^{5,19,26,27}; 3) o PRP pode influenciar no potencial de diferenciação celular das MSC, direcionando-as para uma linhagem específica, visando atender a uma necessidade clínica^{35,39}; 4) o PRP pode diminuir a velocidade da senescência celular^{5,26,35}; 5) o PRP pode influenciar na função parácrina das MSC humanas⁶¹.

O uso do PRP autólogo é considerado ideal para preparo de células humanas destinadas a ensaios clínicos, por não oferecer riscos de rejeição imunológica para o paciente que receberá o transplante celular. Alguns estudos descrevem que as células humanas podem proliferar mais rapidamente quando suplementadas com produtos plasmáticos autólogos do que alogênicos²⁴. Já existem produtos alogênicos comercialmente disponíveis, que podem ser utilizados para produção de células em larga escala. É uma opção econômica com variação limitada no seu conteúdo, mas que pode oferecer risco de aloimunização¹⁹. As limitações que ainda existem sobre a aplicação do PRP humano em culturas celulares *xeno-free* são a necessidade de um grande volume de sangue para seu preparo e impacto de sua variabilidade biológica nas células cultivadas^{22,33}.

Uma fonte estratégica de sangue periférico e seus derivados para produção de PRP humano utilizado para suplementação de culturas celulares *xeno-free* são os bancos de sangue. Também conhecidos como hemocentros, eles constituem laboratórios especializados no armazenamento e processamento de sangue periférico que será destinado ao atendimento clínico. Em média, de 20 a 40% do sangue disponível é descartado por motivos diversos, principalmente pelo prazo de uso vencido. O índice de perdas de concentrado de plaquetas em banco de sangue públicos atinge 33%. De acordo com as diretrizes gerais para os bancos de sangue, o concentrado de plaquetas tem vida de prateleira de cinco dias. Devido a essa vida útil curta, é comum o descarte de grande quantidade deste produto após a data de transfusão recomendada^{62,63,64,65,66}. Além de evitar o desperdício, o uso do sangue e seus derivados em bancos de sangue é uma forma de assegurar que os produtos de suplemento à cultura celular tenham uma boa qualidade, pois seguem um padrão de processamento que minimiza contaminação e proliferação microbiana, e são submetidos a uma análise detalhada no ato de coleta para verificar a presença de possíveis doenças infecciosas, como sífilis, vírus HIV, hepatite B e hepatite C (recomendações descritas na Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC nº 24, de 24 de janeiro de 2002).

A Lei nº 10.205, de 21 de março de 2001 e a Portaria nº 2.712, de 12 de novembro de 2013 tratam especificamente de sangue, seus componentes e derivados, assim como do regulamento técnico de procedimentos hemoterapêuticos, respectivamente^{67,68}. Elas viabilizam o uso deste material biológico, que foi captado para



fins terapêuticos e que não teve uso programado, para produção de compostos e derivados destinados a outras finalidades terapêuticas. O uso semelhante poderá ser estendido então à produção do PRP para cultivo de células humanas e pode movimentar o segmento econômico de empresas de biotecnologia, estimulando investimentos em produção de insumos para pesquisa. Os hemocomponentes excedentes são considerados como matéria prima de boa qualidade, e já foram sugeridos como “ouro líquido”^{62,66,69}, em função da alta lucratividade das empresas que investem em inovações tecnológicas.

CONCLUSÕES

Este estudo de revisão comparou os resultados encontrados em diferentes métodos de suplemento de cultura celular *xeno-free* e verificou que o plasma rico em plaquetas humano é o candidato ideal para substituir o SFB em cultura de células humanas destinadas à pesquisa clínica. Não há risco de alterações genéticas da população celular^{21,27,32}, tampouco perda de suas propriedades biológicas^{5,19,27,32} e contaminação com patógenos que poderia causar danos à saúde do paciente que receberá o transplante celular^{27,32}. Os desafios que existem, neste momento, para que o PRP seja efetivamente adotado no preparo de células humanas são: 1) padronizar processo de produção do PRP humano (número,

velocidade, gravidade e tempo de centrifugações), 2) determinar a concentração ideal de PRP humano para suplementar o meio de cultura de diferentes tipos celulares; 3) estabelecer os controles de qualidade para detectar possíveis contaminações exógenas; 4) determinar estratégias para diminuir variabilidade biológica; e 5) certificar os laboratórios e pesquisadores qualificados para oferecer tais produtos para o mercado nacional. É necessário o desenvolvimento de ensaios clínicos para avaliar a segurança e eficácia do transplante de células humanas que foram submetidas à suplementação com plasma rico em plaquetas durante o processo de cultivo e expansão celular *in vitro*. Estas condições devem ser estudadas como uma prioridade da comunidade científica e também avaliadas pelos órgãos regulatórios que fiscalizam os ensaios clínicos.

O concentrado de plaquetas destinados ao descarte nos centros de hemoterapia pode ser utilizado para produção do PRP humano. Sendo congelado, esse material de descarte pode ser guardado e processado em condições adequadas. A finalidade de seu uso final seria o cultivo de células humanas em condições *xeno-free*, para sua aplicação subsequente no cultivo de células destinadas às terapias avançadas. As autoridades competentes deverão estabelecer os parâmetros de sua manipulação e os controles de qualidade necessários para liberar o posterior uso desse produto nos procedimentos de terapias avançadas.

REFERÊNCIAS

1. MacDermott RP, Bragdon MJ. Fetal calf serum augmentation during cell separation procedures accounts for the majority of human autologous mixed leukocyte reactivity. *Behring Inst Mitt.* 1983;72(72):122-8.
2. Sundin M, Ringdén O, Sundberg B, Nava S, Götherström C, Le Blanc K. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica.* 2007;92(9):1208-15. <https://doi.org/10.3324/haematol.11446>
3. Xia H, Vijayaraghavan B, Belák S, Liu L. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. *PLoS One.* 2011;6(12): e28553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028553>
4. Giammarioli M, Ridpath JF, Rossi E, Bazzucchi M, Casciari C, De Mia GM. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals.* 2015;43(4):220-4. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.05.009>
5. Phetfong J, Tawonsawatruk T, Seenprachawong K, Srisarin A, Isarankura-Na-Ayudhya C, Supokawej A. Re-using blood products as an alternative supplement in the optimisation of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stem cell culture. *Bone Joint Res.* 2017;6(7):414-22. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.67.BJR-2016-0342.R1>
6. Gstraunthaler G, Lindl T, van der Valk J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology.* 2013;65(5):791-3. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9633-8>
7. Hemeda H, Giebel B, Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2014;16(2):170-80. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.004>
8. Swamynathan P, Venugopal P, Kannan S, Thej C, Kolkundar U, Bhagwat S et al. Are serum-free and xeno-free culture conditions ideal for large scale clinical grade expansion of Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells? A comparative study. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(4):88. <https://doi.org/10.1186/scrt477>
9. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC et al.; Canadian Critical Care Trials Group. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One.* 2012;7(10):e47559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047559>
10. Kreuz PC, Krüger JP, Metzlaß S, Freymann U, Endres M, Pruss A et al. Platelet-Rich plasma preparation types show impact on chondrogenic differentiation, migration, and proliferation of human subchondral mesenchymal progenitor cells. *Arthroscopy.* 2015;31(10):1951-61. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2015.03.033>
11. Friedenstien AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393-403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>



12. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
13. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>
14. Dessels C, Potgieter M, Pepper MS. Making the switch: alternatives to fetal bovine serum for adipose-derived stromal cell expansion. *Front Cell Dev Biol*. 2016; 17;4:115. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00115>
15. Patrikoski M, Juntunen M, Boucher S, Campbell A, Vemuri MC, Mannerström B et al. Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(2):27. <https://doi.org/10.1186/scrt175>
16. Ylostalo JH, Bartosh TJ, Tiblow A, Prockop DJ. Unique characteristics of human mesenchymal stem/progenitor cells (MSC) pre-activated in 3D cultures under different conditions. *Cytotherapy*. 2014;16(11):1486-500. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.07.010>
17. Hebert TL, Wu X, Yu G, Goh BC, Halvorsen YD, Wang Z et al. Culture effects of epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on cryopreserved human adipose-derived stromal/stem cell proliferation and adipogenesis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3(7):553-61. <https://doi.org/10.1002/term.198>
18. Gharibi B, Hughes FJ. Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(11):771-82. <https://doi.org/10.5966/sctm.2010-0031>
19. Burnouf T, Strunk D, Koh MB, Schallmoser K. Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016 Jan;76:371-87. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.065>
20. Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 Jul;26(7):812-20. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04415.x>
21. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, Pacheco IC, Amaral RJC, Granjeiro JM et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Jun;4(3):67. <https://doi.org/10.1186/scrt218>
22. Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, Cote MP, Romeo AA, Bradley JP et al. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J Bone Joint Surg Am*. 2012; 15;94(4):308-16. <https://doi.org/10.2106/JBJS.K.00430>
23. Bogdanova A, Berzins U, Nikulshin S, Skrastina D, Ezerta A, Legzdina D et al. Characterization of human adipose-derived stem cells cultured in autologous serum after subsequent passaging and long term cryopreservation. *J Stem Cells*. 2014;9(3):135-48. <https://doi.org/jsc.2014.9.3.135>
24. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*. 2005;23(9):1357-66. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0094>
25. Lindroos B, Boucher S, Chase L, Kuokkanen H, Huhtala H, Haataja R et al. Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro. *Cytotherapy*. 2009;11(7):958-72. <https://doi.org/10.3109/14653240903233081>
26. Rubio-Azpeitia E, Andia I. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014; 8;4(1):52-62. <https://doi.org/10.11138/mltj/2014.4.1.052>
27. Atashi F, Jaconi ME, Pittet-Cuénod B, Modarressi A. Autologous platelet-rich plasma: a biological supplement to enhance adipose-derived mesenchymal stem cell expansion. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21(3):253-62. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0206>
28. Miroshnychenko O, Chang WT, Dragoo JL. The use of platelet-rich and platelet-poor plasma to enhance differentiation of skeletal myoblasts: implications for the use of autologous blood products for muscle regeneration. *Am J Sports Med*. 2017;45(4):945-53. <https://doi.org/10.1177/0363546516677547>
29. Zhang J, Wang JK. Platelet-rich plasma releasate promotes differentiation of tendon stem cells into active tenocytes. *Am J Sports Med*. 2010;38(12):2477-86. <https://doi.org/10.1155/2017/1075975>
30. Cavallo C, Filardo G, Mariani E, Kon E, Marcacci M, Facchini A et al. Comparison of platelet-rich plasma formulations for cartilage healing: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Am*. 2014;96(5):423-9. <https://doi.org/10.2106/JBJS.M.00726>
31. Yin W, Xu H, Sheng J, Zhu Z, Jin D, Hsu P et al. Optimization of pure platelet-rich plasma preparation: A comparative study of pure platelet-rich plasma obtained using different centrifugal conditions in a single-donor model. *Exp Ther Med*. 2017;14(3):2060-70. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4726>
32. Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*. 2007;25(5):1270-8. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0627>
33. Chieragato K, Castegnaro S, Madeo D, Astori G, Pegoraro M, Rodeghiero F. Epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-bb can substitute for fetal bovine serum and compete with human platelet-rich plasma in the ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue. *Cytotherapy*. 2011;13(8):933-43. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.583232>



34. Shanbhag S, Stavropoulos A, Suliman S, Hervig T, Mustafa K. Efficacy of humanized mesenchymal stem cell cultures for bone tissue engineering: a systematic review with a focus on platelet derivatives. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017; 10.1089. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2017.0093>
35. Feng Y, Sun Y, Jia W, Zhang C. Platelet-rich plasma and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ synergistically stimulate osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett*. 2010;32(5):635-42. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0198-8>
36. Tavakolinejad S, Khosravi M, Mashkani B, Ebrahimzadeh Bideskan A, Sanjar Mossavi N, Parizadeh MR et al. The effect of human platelet-rich plasma on adipose-derived stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Iran Biomed J*. 2014;18(3):151-7. <https://doi.org/10.6091/ibj.1301.2014>
37. Casati L, Celotti F, Negri-Cesi P, Sacchi MC, Castano P, Colciago A. Platelet derived growth factor (PDGF) contained in Platelet Rich Plasma (PRP) stimulates migration of osteoblasts by reorganizing actin cytoskeleton. *Cell Adhes Migr*. 2014;8(6): 595-602. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.972785>
38. Otero L, Carrillo N, Calvo-Guirado JL, Villamil J, Delgado-Ruiz RA. Osteogenic potential of platelet-rich plasma in dental stem-cell cultures. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2017;55(7):697-702. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2017.05.005>
39. Kobayashi E, Fujioka-Kobayashi M, Sculean A, Chappuis V, Buser D, Schaller B, et al. Effects of platelet rich plasma (PRP) on human gingival fibroblast, osteoblast and periodontal ligament cell behaviour. *BMC Oral Health*. 2017;17:91. <https://doi.org/10.1186/s12903-017-0381-6>
40. Cáceres M, Hidalgo R, Sanz A, Martínez J, Riera P, Smith PC. Effect of platelet-rich plasma on cell adhesion, cell migration, and myofibroblastic differentiation in human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2008 Apr;79(4):714-20. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.070395>
41. Rothan HA, Djordjevic I, Bahrani H, Paydar M, Ibrahim F, Abd Rahman N et al. Three-dimensional culture environment increases the efficacy of platelet rich plasma releasate in prompting skin fibroblast differentiation and extracellular matrix formation. *Int J Med Sci*. 2014;11(10):1029-38. <https://doi.org/10.7150/ijms.8895>
42. Zahn J, Loibl M, Sprecher C, Nerlich M, Alini M, Verrier S et al. Platelet-rich plasma as an autologous and proangiogenic cell delivery system. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1075975. <https://doi.org/10.1177/0363546510376750>
43. Achilli TM, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(10):1347-60. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.707181>
44. Page H, Flood P, Reynaud EG. Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell Tissue Res*. 2013;352(1):123-31. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1441-5>
45. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. 2005;205(2):228-36. <https://doi.org/10.1002/jcp.20391>
46. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol*. 2007;211(1):121-30. <https://doi.org/10.1002/jcp.20911>
47. Bajek A, Gurtowska N, Gackowska L, Kubiszewska I, Bodnar M, Marszałek A et al. Does the liposuction method influence the phenotypic characteristic of human adipose-derived stem cells? *Biosci Rep*. 2015;35(3):e00212. <https://doi.org/10.1042/BSR20150067>
48. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Bork S, Guelly C, Obenauf AC et al. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica*. 2010;95(6):867-74. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.011692>
49. Bernardi M, Agostini F, Chiericato K, Amati E, Durante C, Rassu M et al. The production method affects the efficacy of platelet derivatives to expand mesenchymal stromal cells in vitro. *J Transl Med*. 2017;15(1):90. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1185-9>
50. Juhl M, Tratwal J, Follin B, Søndergaard RH, Kirchhoff M, Ekblond A et al. Comparison of clinical grade human platelet lysates for cultivation of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue. *Scand J Clin Lab Invest*. 2016;76(2):93-104. <https://doi.org/10.3109/00365513.2015.1099723>
51. Matthyssen S, Ni Dhubbghaill S, Van Gerwen V, Zakaria N. Xeno-Free Cultivation of mesenchymal stem cells from the corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(5):2659-65. <https://doi.org/10.1167/iov.17-21676>
52. Mojica-Henshaw MP, Jacobson P, Morris J, Kelley L, Pierce J, Boyer M et al. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy*. 2013;15(12):1458-68. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.06.014>
53. Trojahn Kølbe SF, Oliveri RS, Glovinski PV, Kirchhoff M, Mathiasen AB, Elberg JJ et al. Pooled human platelet lysate versus fetal bovine serum-investigating the proliferation rate, chromosome stability and angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells intended for clinical use. *Cytotherapy*. 2013;15(9):1086-97. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.01.217>
54. Riis S, Nielsen FM, Pennisi CP, Zachar V, Fink T. Comparative analysis of media and supplements on initiation and expansion of adipose-derived stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(3):314-24. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0148>
55. Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, Sarr MG, Bartunek J et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant*. 2011;20(6):797-811. <https://doi.org/10.3727/096368910X543376>



56. Iudicone P, Fioravanti D, Bonanno G, Miceli M, Lavorino C, Totta P et al. Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *J Transl Med*. 2014;12(1):28. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-28>
57. Gonzales VK, de Mulder EL, de Boer T, Hannink G, van Tienen TG, van Heerde WL et al. Platelet-rich plasma can replace fetal bovine serum in human meniscus cell cultures. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19(11):892-9. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0009>
58. Mark P, Kleinsorge M, Gaebel R, Lux CA, Toelk A, Pittermann E et al. Human mesenchymal stem cells display reduced expression of CD105 after culture in serum-free medium. *Stem Cells Int*. 2013;2013:698076. <https://doi.org/10.1155/2013/698076>
59. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions: influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(7):1430-7.
60. Chou ML, Burnouf T. Current methods to manufacture human platelet lysates for cell therapy and tissue engineering: possible trends in product safety and standardization. *ISBT Sci Ser*. 2017;12(1):168-75. <https://doi.org/10.1111/vox.12316>
61. Willemsen JC, Spiekman M, Stevens HP, Lei B, Harmsen MC. Platelet-rich plasma influences expansion and paracrine function of adipose-derived stromal cells in a dose-dependent fashion. *Plast Reconstr Surg*. 2016;137(3):554e-65e. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000479995.04255.bb>
62. Amorim L. Aspectos técnicos da produção de Hemoderivados. Rio de Janeiro: Hemorio; 2008.
63. Novis DA, Renner S, Friedberg RC, Walsh MK, Saladino AJ. Quality indicators of fresh frozen plasma and platelet utilization. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(5):527-32.
64. Verma A, Agarwal P. Platelet utilization in the developing world: strategies to optimize platelet transfusion practices. *Transfus Apheresis Sci*. 2009;41(2):145-9. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2009.07.005>
65. Pérez Vaquero MÁ, Gorria C, Lezaun M, López FJ, Monge J, Eguizabal C et al. Optimization of the management of platelet concentrate stocks in the Basque Country using mathematical simulation. *Vox Sang*. 2016;110(4):369-75. <https://doi.org/10.1111/vox.12377>
66. Sequeira CD. Como o governo deixou estragar 55 mil bolsas de sangue. *Revista Isto É*. 2012[acesso 20 set 2017;(2234). Disponível em: https://istoe.com.br/234306_COMO+O+GOVERNO+DEIXOU+ESTRAGAR+55+MIL+BOLSAS+DE+SANGUE/
67. Brasil. Lei Nº 10.205, de 21 de março de 2001. Regulamenta o § 4o do art. 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, estabelece o ordenamento institucional indispensável à execução ad quada dessas atividades, e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 22 mar 2001.
68. Ministério da Saúde (BR). Portaria Nº 2.712, de 12 de nov de 2013. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. *Diário Oficial União*. 13 nov 2013.
69. Cohn EJ. The separation of blood into fractions of therapeutic value. *Ann Intern Med*. 1947;26(3):341-52. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-26-3-341>

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.
Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.